

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.21.006
文章编号: 1005-8982 (2024) 21-0034-09

实验研究·论著

人参皂苷 Rg3 治疗放射性直肠炎大鼠的作用机制研究*

扈婷婷¹, 林丽莉², 段小钰¹, 蔡宏懿¹

(1. 甘肃省人民医院 放疗中心, 甘肃 兰州 730000; 2. 宿迁市第一人民医院, 江苏 宿迁 223800)

摘要: 目的 基于 TNF- α /NF- κ B 及 Caspase-8 信号通路, 研究人参皂苷 Rg3 (GRg3) 治疗放射性直肠炎大鼠的机制。**方法** 48 只雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松组、低剂量 GRg3 治疗组、中剂量 GRg3 治疗组、高剂量 GRg3 治疗组, 每组 8 只。6MV X 射线单次 21.5 Gy 腹部照射进行模型复制, 照射后第 8 天开始给药, 观察大鼠情况并称重, 2 周后腹主动脉取血并处死解剖。HE 染色观察直肠组织病理学变化, 酶联免疫吸附试验检测血清 TNF- α 、IL-4、IL-10 水平, 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测直肠组织 IKK- β 、I κ B- α 、Caspase-8 基因表达, Western blotting 检测 IKK- β 、I κ B- α 、p-I κ B- α 、NF- κ B p50、Caspase-8 蛋白表达。**结果** 照射后第 6 天, 与对照组比较, 其他各组大鼠体重明显降低 ($P < 0.05$), 且除对照组外的其他组大鼠体重比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 开始灌胃后, 对照组大鼠体重逐步上升, 模型组大鼠体重不断下降, 地塞米松组和 GRg3 治疗组大鼠在治疗前 3 天体重较治疗前无明显变化, 从第 4 天开始逐渐增长; 与模型组相比, 灌胃第 8、14 天, 地塞米松组和高剂量 GRg3 治疗组大鼠体重明显升高 ($P < 0.05$)。治疗 2 周后, 地塞米松组直肠组织结构完整, 黏膜层见少量的炎症细胞浸润; 低剂量 GRg3 治疗组直肠组织大范围溃疡, 肠腺形状、大小不一, 数量减少, 并伴大量炎症细胞浸润, 少量肠腺扩张, 腺腔内可见坏死细胞碎片, 损伤侵及黏膜下层, 黏膜肌层及黏膜下层亦可见炎症细胞浸润; 中剂量 GRg3 治疗组见少量黏膜上皮细胞坏死脱落, 肠腺形状、大小不一, 伴中等量炎症细胞浸润, 少量肠腺扩张, 腺腔内可见坏死细胞碎片; 高剂量 GRg3 治疗组直肠组织结构完整, 见黏膜层水肿, 肠腺排列疏松, 伴炎症细胞浸润。与对照组比较, 模型组大鼠血清 TNF- α 水平升高 ($P < 0.05$), IL-4、IL-10 水平降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 地塞米松组及高剂量 GRg3 治疗组血清 TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$), IL-4、IL-10 水平升高 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 模型组大鼠直肠组织 IKK- β 、I κ B- α 及 Caspase-8 基因表达升高 ($P < 0.05$); 经过不同的干预治疗后, 与模型组比较, 各治疗组 IKK- β 、I κ B- α 及 Caspase-8 基因表达均降低 ($P < 0.05$), 且随着 GRg3 治疗剂量的升高各因子表达呈下降趋势; 地塞米松组与高剂量 GRg3 治疗组 IKK- β 、I κ B- α 及 Caspase-8 mRNA 的表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较, 模型组大鼠直肠组织 IKK- β 、p-I κ B- α 、胞核 NF- κ B p50 及 Caspase-8 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), I κ B- α 、胞浆 NF- κ B p50 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 经过不同治疗后, 与模型组相比, 地塞米松及中、高剂量 GRg3 治疗组 IKK- β 、p-I κ B- α 、胞核 NF- κ B p50 及 Caspase-8 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$), I κ B- α 及胞浆 NF- κ B p50 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$)。中、高剂量 GRg3 治疗组与地塞米松组各因子蛋白表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** GRg3 通过抑制 IKK- β 的表达, 减少 I κ B- α 的磷酸化, 增加胞浆中 NF- κ B p50 的滞留, 减轻放射性直肠炎, 促进肠道组织损伤修复; GRg3 能抑制电离辐射引起的肠道细胞凋亡减轻炎症反应。

关键词: 放射性直肠炎; 人参皂苷 Rg3; 大鼠

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

Investigation of the mechanism of ginsenoside Rg3 in the treatment of radiation proctitis in rats*

收稿日期: 2024-05-09

* 基金项目: 甘肃省青年科技基金计划 (No: 21JR11RA200)

[通信作者] 蔡宏懿, E-mail: gschy333@163.com

Hu Ting-ting¹, Lin Li-li², Duan Xiao-yu¹, Cai Hong-yi¹

(1. Department of Radiotherapy, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou, Gansu 730000, China;

2. Department of Radiotherapy, Suqian First Hospital, Suqian, Jiangsu 223800, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of ginsenoside Rg3 (GRg3) in the treatment of radiation proctitis in rats, this study focuses on the TNF- α /NF- κ B and Caspase-8 signaling pathways. **Methods** A total of 48 male Wistar rats were randomly assigned to control group, model group, dexamethasone group, low-dose GRg3 treatment group, medium-dose GRg3 treatment group, and high-dose GRg3 treatment group, with 8 rats in each group. The model was replicated by a single dose of 21.5 Gy abdominal irradiation using 6MV X-rays. Drug administration began on the 8th day after irradiation. The rats' conditions were observed and their weights were measured. Two weeks later, blood was collected from the abdominal aorta before the rats were euthanized for dissection. Hematoxylin and eosin staining was used to observe pathological changes in the rectal tissue. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to measure serum levels of TNF- α , IL-4, and IL-10. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was conducted to assess IKK- β , I κ B- α , and Caspase-8 mRNA expression in rectal tissue. Western blotting was employed to analyze IKK- β , I κ B- α , p-I κ B- α , NF- κ B p50, and Caspase-8 protein expression. **Results** On the 6th day after irradiation, the body weight of rats in all groups except the control group showed a significant decrease ($P < 0.05$), with no statistical significance observed in comparison to each other ($P > 0.05$). Following instillation, the body weight of rats in the control group gradually increased, while those in the model group exhibited continuous decline. The body weight of rats in both the dexamethasone and GRg3 treatment groups remained relatively stable for the first 3 days of treatment, followed by gradual increases from day four onwards. Notably, on the 8th and 14th day of gavage, significant increases were observed in the body weight of rats within these two treatment groups compared to that of the model group ($P < 0.05$). After a two-week treatment period, rectal tissue structure was found to be intact in the dexamethasone group; however, a small amount of inflammatory cell infiltration was noted within its mucosal layer. Conversely, wide-ranging ulceration along with varied intestinal gland morphology and extensive inflammatory cell infiltration were evident in rectal tissues from low-dose GRg3 treated rats. Compared to controls, serum TNF- α levels were elevated while IL-4 and IL-10 levels were decreased within model group rats ($P < 0.05$). In contrast, both TNF- α levels decreased significantly ($P < 0.05$) while IL-4 and IL-10 levels increased significantly ($P < 0.05$) following treatments with dexamethasone or high-dose GRg3 when compared to model group values. In comparison to the control group, there was an increase in mRNA expression levels for IKK- β , I κ B- α , and Caspase-8 observed within the rectal tissue samples from the model group ($P < 0.05$). Following various intervention treatments, the mRNA expression levels for these factors decreased across all treatment groups when compared to the model cohort ($P < 0.05$) with a consistent downward trend as GRg3 dosage increased. There was no significant difference in the expression of IKK- β , I κ B- α and Caspase-8 mRNA between dexamethasone group and high-dose GRg3 group ($P > 0.05$). Compared to the control group, the protein expressions of IKK- β , p-I κ B- α , nuclear NF- κ B p50, and Caspase-8 in the rectal tissue of the model group were found to be increased ($P < 0.05$), while the protein expressions of I κ B- α and cytoplasmic NF- κ B p50 were decreased ($P < 0.05$). Following different treatments, it was observed that compared to the model group, the protein expressions of IKK- β , p-I κ B- α , nuclear NF- κ B p50, and Caspase-8 in both dexamethasone and medium and high dose GRg3 treatment groups were decreased ($P < 0.05$), whereas the protein expressions of I κ B- α and cytoplasmic NF- κ B p50 were increased ($P < 0.05$). There was no significant difference in protein expression between the dexamethasone group and medium and high dose GRg3 group ($P > 0.05$). **Conclusions** GRg3 has been shown to inhibit the expression of IKK- β , reduce the phosphorylation of I κ B- α , increase the retention of NF- κ B p50 in the cytoplasm, alleviate radiation enteritis, and promote the repair of intestinal tissue damage. Additionally, GRg3 can inhibit intestinal cell apoptosis induced by ionizing radiation and reduce inflammation.

Keywords: radiation proctitis; ginsenoside Rg3; rat

放射治疗(以下简称放疗)是盆腹腔恶性肿瘤多学科综合治疗模式的重要组成部分。直肠处于

骨盆边缘的固定解剖位置,紧邻受照射器官,因此,电离辐射引起的直肠损伤是盆腹腔放疗最常见的

并发症之一,又被称为放射性直肠炎(radiation proctitis, RP)^[1]。所有接受盆腹腔放射治疗的患者中,大约 75% 出现过急性放射性直肠炎(acute radiation proctitis, ARP),症状包括腹痛腹泻、排便急迫、黏液样分泌物等。尽管停止放疗后 ARP 患者的症状多能自行缓解,但仍有高达 20% 的患者发展成为慢性放射性直肠炎(chronic radiation proctitis, CRP),严重者甚至出现肠痿、大出血,需要中断放疗,严重影响治疗效果,降低患者生存率^[2]。临床针对 RP 治疗的药物多治标不治本,以缓解症状为主,甚至长期服用部分治疗药物还会产生药物依赖、便秘等副反应^[3]。为此,急需开辟一条针对 RP 病因的治疗新途径。

人参皂苷 Rg3(ginsenoside Rg3, GRg3)是一种四环三萜皂苷单体,是人参提取物的主要生物活性成分,常用于肿瘤相关疾病的辅助治疗,其除了直接发挥抗肿瘤作用外,还能提高肿瘤患者的放化疗敏感性^[4-6]。前期研究表明 GRg3 对射线引起的大鼠 RP 具有治疗作用^[7]。因此,本研究在此基础上进一步探讨其作用机制,以期为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

兰州大学实验动物中心清洁级 Wistar 雄性大鼠 48 只[实验动物使用许可证号:SYXK(甘)2013-0003],体重 180~200 mg。实验开始前 7 d 饲养于甘肃省人民医院实验动物房以适应环境,环境温度 21~27 ℃,相对湿度 50%~60%,气流速度 20 cm²/s,换气次数 15 次/min,维持性鼠食喂养,自由饮水,12 h 明暗交替。

1.2 实验药物、试剂及仪器

参一胶囊(吉林亚泰制药股份有限公司,货号:Z20030044),戊巴比妥钠(上海通善生物科技有限公司,货号:Te-P8411),0.9%生理盐水(四川科伦药业股份有限公司,货号:H51021157),地塞米松磷酸钠注射液(国药集团容升制药有限公司,货号:H41020035)。大鼠白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)(MM-0191R1)、白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)(MM-0195R1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒

(MM-0180R2)均购自江苏酶免实业有限公司,TRIeasyTM总 RNA 提取试剂盒(19201ES60)、逆转录试剂盒(11141ES60)、荧光定量试剂盒(11201ES60)均购自上海翌圣生物科技有限公司,半胱氨酸蛋白酶-8(cysteinyI aspartate specific proteinase-8, Caspase-8)(ZK-6802)、 β 肌动蛋白(β -actin)(ZK-0473)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)(ZK-6287)均购自上海臻科生物科技有限公司,核因子 κ B 抑制因子 α (inhibitor of kappa B- α , I κ B- α)(FT-P32002R)、核因子 κ B 抑制因子激酶 β (inhibitor of kappa B kinase- α , IKK- β)(FT-T3493)均购自上海梵态生物科技有限公司,核因子 κ B(Nuclear factor kappa B, NF- κ B) p50 一抗、羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,AR1017),磷酸化核因子 κ B 抑制因子 α (phosphonated inhibitor of nuclear factor kappa B- α , p-I κ B- α)一抗(上海西格生物科技有限公司,XG-E988647),核蛋白、浆蛋白提取试剂盒(沈阳万类生物科技有限公司,WLA020)。DS-11 超微量分光光度计(美国 DeNovix 公司),逆转录仪 PTC-200、凝胶成像仪(美国 Bio-rad 公司,型号:DocTM XR+ 1708195),实时荧光定量聚合酶链反应仪(瑞士 Roche 公司,型号:Roche Applied Science),酶标仪(美国 Thermo 公司,型号:MK3),电泳仪(北京市六一仪器厂,型号:DYCZ-24DN),脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,型号:TS-1000),直线加速器(德国 Siemens 公司,型号:ONCOR)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组与模型复制 将 48 只雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松组、低剂量 GRg3 治疗组、中剂量 GRg3 治疗组和高剂量 GRg3 治疗组,各 8 只。除对照组大鼠外,各组大鼠在照射前 12 h 予以禁食,使用 3% 戊巴比妥钠麻醉,剂量为 0.1 mL/100 g。待大鼠四肢完全松弛瘫软失去抵抗力后,将其以仰卧体位固定于木板上。采用 6 MV X 射线照射,剂量为 21.5 Gy,照射上界为耻骨联合,下界为肛门,周围不用铅块遮挡,照射野面积 3.5 cm × 5.0 cm,源皮距 100 cm,剂量率 300 cGy/min^[8]。照射后解除固定,注意保暖,避免大鼠发生低温死亡,待大鼠全部清醒后运回实验动物房继续饲养。以大鼠出现精神饮食状况下降、体重减轻及黑便、黏液

样便、稀便等大便性状改变为 RP 模型复制成功。

1.3.2 给药方法 将 GRg3 配置成 4 mg/mL 的混悬液备用。照射后第 8 天开始, 每天同一时间段给大鼠灌胃, 连续 14 d。根据每日称量的大鼠体重, 给与相应的药量灌胃。对照组及模型组每天给予生理盐水 40 mL/kg 灌胃, 地塞米松组给予地塞米松溶液 1.425 mg/kg 灌胃, 低、中、高剂量 GRg3 治疗组分别给予制备好的 GRg3 混悬液 20、40 和 80 mg/kg 灌胃。

1.3.3 观察指标及样本获取 观察大鼠每日进食量、饮水量、粪便变化情况、自主活动及反应速度等, 每天同一时间段称重并记录。治疗 2 周后将大鼠麻醉后腹主动脉取血约 5 mL 并处死解剖。取距肛门 > 2 cm 的直肠组织约 4 cm, 沿纵轴剖开分成两部分, 放入生理盐水洗涤后用滤纸吸干多余水分, 一部分组织用 4% 多聚甲醛溶液固定做病理切片观察, 另一部分组织装入冻存管用液氮转移至 -80 °C 冰箱冷冻保存。

1.3.4 ELISA 检测 IL-4、IL-10、TNF- α 水平 各组大鼠腹主动脉采血 5 mL, 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 检测血清 IL-4、IL-10、TNF- α 水平。严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.5 实时荧光定量聚合酶链反应检测 IKK- β 、I κ B- α 、Caspase-8 基因表达 采用 TRIzol 法提取总 RNA, 根据逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。采用 SYBR Green Master Mix 进行 PCR 扩增, 检测直肠组织中 IKK- β 、I κ B- α 、Caspase-8 的基因表达。IKK- β 引物正向序列 5'-AGATCGCCTGTAGCAAA-3', 反向序列: 5'-CTCCAGTCTAGGGTCGTG-3'; I κ B- α 引物正向序列: 5'-CCCAAGTACCCGGATACAGCA-3', 反向序列: 5'-GTCATCCTAGGGCAACTCATCTT-3'; Caspase-8 引物正向序列: 5'-AAGAAGTGGCTGCCCTCAAG-3', 反向序列: 5'-GCATAACCCTGTAGGCAGAAACC-3'; 内参 GAPDH 引物正向序列: 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3', 反向序列: 5'-GGTGGAGAATGGGAGTTGCT-3'。扩增程序: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 40 个循环。

1.3.6 Western blotting 测定 IKK- β 、I κ B- α 、p-I κ B- α 、p50、Caspase-8 蛋白表达 取各组大鼠距肛门 > 2 cm 的直肠组织样本, 分别按 1:10、1:100 加入 1 mL RIPA 裂解液和 10 μ L PMSF, NF- κ B P50 蛋白分别加 10 μ L 磷酸化蛋白酶抑制剂 A 液、B 液裂解直肠组

织, 用 BCA 法测定蛋白浓度并定量。通过 SDS-PAGE 制胶, PVDF 膜转膜、封闭, 一抗、二抗孵育后使用 ECL 化学发光液显色。IKK- β 、I κ B- α 、p-I κ B- α 、p50、Caspase-8 的一抗稀释比均为 1:1 000; 内参蛋白 β -actin 为 1:2 000。二抗稀释比为 1:10 000。提取胞浆蛋白和胞核蛋白。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0、GraphPad Prism 8 和 Image J 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 两两比较用 Bonferroni 法或 Dunnett's T3 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

对照组大鼠一般状况良好, 反应灵敏, 精神、活动正常, 进食、饮水量随体重升高逐步增加, 毛发整洁有光泽, 便成形颗粒样粪便。除对照组外, 照射后第 3~5 天, 其他大鼠开始出现不同程度的 RP 症状, 有 5 只黑便, 16 只黏液样便, 8 只糊状便, 5 只稀便, 3 只出现恶病质, 大鼠进食、饮水量及活动量较对照组明显减少, 喜蜷缩聚集于角落, 抓取时反抗力弱, 肛周毛发不洁, 可见部分脱落。第 6 天, 地塞米松组 1 只恶病质大鼠死亡。照射后第 8 天, 各组开始灌胃治疗。对照组大鼠饮食活动如常。模型组大鼠进食、饮水量不断下降, 肠炎症状最重, 至生理盐水灌胃第 8 天, 进食量约为灌胃前的一半。地塞米松组和 GRg3 治疗组大鼠治疗前 3 天状态较前无明显变化, 从第 4 天开始进食、饮水量逐渐增多, 大鼠粪便也逐渐正常。与模型组相比, 灌胃 14 天后, 高剂量 GRg3 治疗组大鼠精神明显好转, 活动量增多, 毛发亮白光泽。灌胃过程中, 模型组和低剂量 GRg3 治疗组各死亡 1 只大鼠 (见图 1)。各组大鼠照射前体重比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。照射后第 6 天, 各组大鼠体重比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 其他组低于对照组, 且除对照组外的其他组大鼠体重比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05); 开始灌胃后, 对照组大鼠体重逐步上升, 每天增长 2~3 g, 模型组大鼠体重不断下降, 地塞米松组和 GRg3 治疗组大鼠在治疗前 3 天体重较治疗前无明显变化, 从第 4 天开始逐渐上升, 每天增长 1~3 g,



图 1 大鼠模型复制过程及复制成功后粪便形状

与模型组比较,灌胃第 8、14 天,地塞米松组和高剂量 GRg3 治疗组大鼠体重升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时期的体重变化 (mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	照射前	照射后第 6 天	灌胃第 2 天	灌胃第 8 天	灌胃第 14 天	F 值	P 值
对照组	8	188.9 ± 3.2	202.2 ± 3.7	208.7 ± 4.4	225.8 ± 3.6	238.9 ± 4.3	206.703	0.000
模型组	7	189.4 ± 5.9	179.7 ± 5.8 ^①	173.6 ± 7.3 ^①	165.0 ± 15.0 ^①	171.4 ± 18.0 ^①	5.127	0.003
地塞米松组	7	186.0 ± 5.0	176.9 ± 5.2 ^①	171.9 ± 4.6 ^①	181.4 ± 4.6 ^{①②}	193.6 ± 5.2 ^{①②}	20.104	0.000
低剂量 GRg3 组	7	185.0 ± 4.8	176.3 ± 5.6 ^①	171.9 ± 7.6 ^①	174.3 ± 12.0 ^①	187.1 ± 11.2 ^①	4.683	0.004
中剂量 GRg3 组	8	188.7 ± 5.9	179.1 ± 6.0 ^①	175.0 ± 6.6 ^①	178.4 ± 8.0 ^①	191.1 ± 7.9 ^{①②}	8.145	0.000
高剂量 GRg3 组	8	184.8 ± 5.8	175.4 ± 6.3 ^①	170.7 ± 6.5 ^①	181.6 ± 7.3 ^{①②}	193.9 ± 7.6 ^{①②}	14.034	0.000
F 值		1.322	27.398	43.572	41.830	40.091		
P 值		0.273	0.000	0.000	0.000	0.000		

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠直肠组织病理学变化

与对照组比较,模型组大鼠直肠组织大面积溃疡,大量肠腺被增生的结缔组织取代,并伴有大量淋巴细胞浸润,见肠腺扩张,上皮扁平化,腔内可见坏死细胞碎片,黏膜下层重度水肿,结缔组织排列疏松,可见出血;地塞米松组直肠组织结构完整,黏膜层见少量的炎症细胞浸润;低剂量 GRg3 治疗组直肠组织大范围溃疡,肠腺形状、大小不一,数量减

少,并伴大量炎症细胞浸润,少量肠腺扩张,腺腔内可见坏死细胞碎片,损伤侵及黏膜下层,黏膜肌层及黏膜下层亦可见炎症细胞浸润;中剂量 GRg3 治疗组见少量黏膜上皮细胞坏死脱落,肠腺形状、大小不一,伴中等量炎症细胞浸润,少量肠腺扩张,腺腔内可见坏死细胞碎片;高剂量 GRg3 治疗组直肠组织结构完整,见黏膜层水肿,肠腺排列疏松,伴炎症细胞浸润。见图 2。

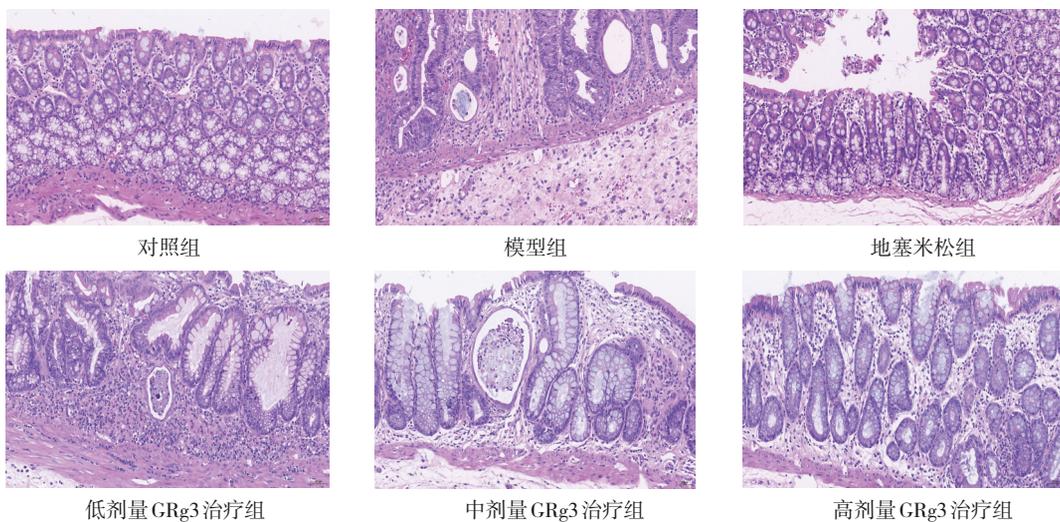


图 2 各组大鼠直肠组织病理学结果 (HE 染色 × 200)

2.3 GRg3 对大鼠血清 IL-4、IL-10、TNF-α 水平的影响

各组大鼠血清 IL-4、IL-10、TNF-α 水平比较,差

异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组大鼠血清 TNF-α 水平升高 ($P < 0.05$), IL-4、IL-10 水平降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,地塞米松组及

高剂量 GRg3 治疗组血清 TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$), IL-4、IL-10 水平升高 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 3。

表 2 各组大鼠血清 IL-4、IL-10、TNF- α 水平比较
(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-4	IL-10	TNF- α
对照组	8	72.90 \pm 2.14	63.17 \pm 3.15	9.47 \pm 1.15
模型组	7	56.96 \pm 3.35	43.71 \pm 3.56	30.59 \pm 1.53
地塞米松组	7	69.90 \pm 2.56	62.36 \pm 1.72	11.29 \pm 2.09
低剂量 GRg3 治疗组	7	58.42 \pm 3.31	49.08 \pm 2.03	26.16 \pm 1.55
中剂量 GRg3 治疗组	8	64.97 \pm 1.30	55.93 \pm 1.44	20.97 \pm 3.12
高剂量 GRg3 治疗组	8	69.42 \pm 3.11	62.32 \pm 2.19	12.94 \pm 1.95
F 值		17.118	32.534	56.330
P 值		0.000	0.000	0.000

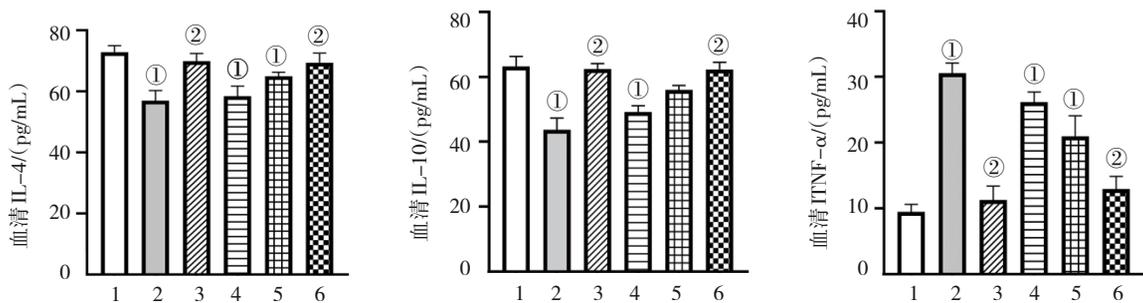
2.4 GRg3 对大鼠直肠组织 IKK- β 、I κ B- α 及 Caspase-8 基因表达的影响

各组大鼠直肠组织 IKK- β 、I κ B- α 及 Caspase-8 基因相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 模型组大鼠直肠组织 IKK- β 、

I κ B- α 及 Caspase-8 基因相对表达量升高 ($P < 0.05$); 经过不同的干预治疗后, 与模型组比较, 各治疗组 IKK- β 、I κ B- α 及 Caspase-8 基因相对表达量均降低 ($P < 0.05$), 且随着 GRg3 治疗剂量的升高各因子表达呈下降趋势; 地塞米松组与高剂量 GRg3 治疗组 IKK- β 、I κ B- α 及 Caspase-8 基因相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3 和图 4。

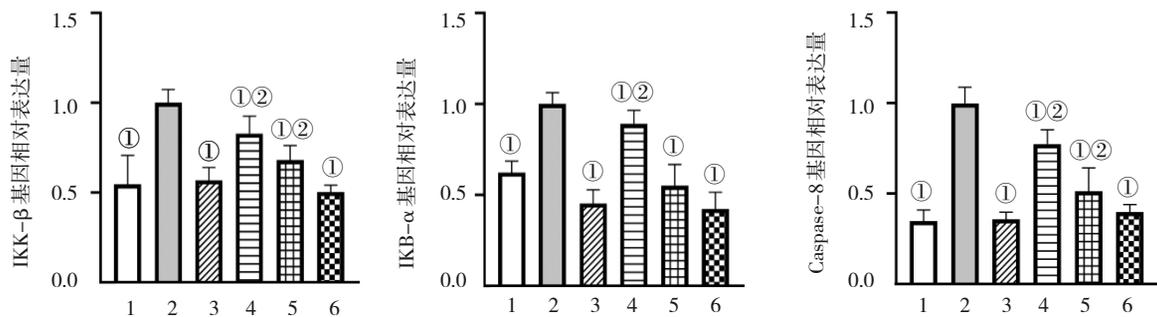
表 3 各组大鼠直肠组织 IKK- β 、I κ B- α 及 Caspase-8 基因相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IKK- β	I κ B- α	Caspase-8
对照组	8	1.0 \pm 0.09	1.0 \pm 0.08	1.0 \pm 0.09
模型组	7	1.61 \pm 0.13	2.37 \pm 0.25	2.57 \pm 0.98
地塞米松组	7	0.73 \pm 0.16	0.89 \pm 0.21	1.69 \pm 0.90
低剂量 GRg3 治疗组	7	1.43 \pm 0.13	1.72 \pm 0.50	1.87 \pm 0.96
中剂量 GRg3 治疗组	8	0.89 \pm 0.22	1.42 \pm 0.44	1.52 \pm 0.57
高剂量 GRg3 治疗组	8	0.69 \pm 0.18	0.72 \pm 0.21	1.33 \pm 0.34
F 值		51.086	17.391	4.664
P 值		0.000	0.000	0.002



1: 对照组; 2: 模型组; 3: 地塞米松组; 4: 低剂量 GRg3 治疗组; 5: 中剂量 GRg3 治疗组; 6: 高剂量 GRg3 治疗组。①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠血清 IL-4、IL-10、TNF- α 表达



1: 对照组; 2: 模型组; 3: 地塞米松组; 4: 低剂量 GRg3 治疗组; 5: 中剂量 GRg3 治疗组; 6: 高剂量 GRg3 治疗组。①与模型组比较, $P < 0.05$; ②与地塞米松组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 大鼠直肠组织 IKK- β 、I κ B- α 及 Caspase-8 基因相对表达量比较

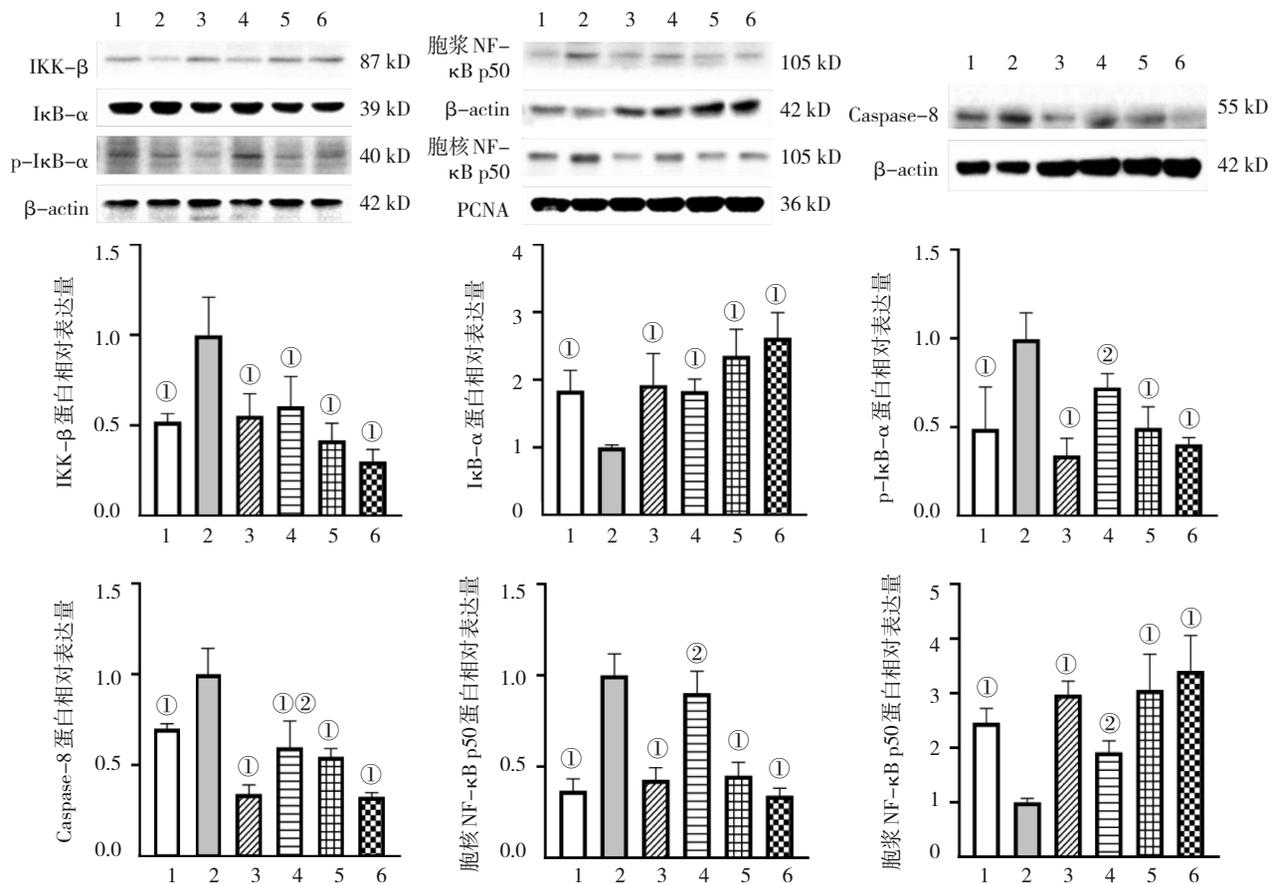
2.5 GRg3对各组大鼠直肠组织 IKK-β、IκB-α、p-IκB-α、Caspase-8及NF-κB p50 蛋白的影响

各组大鼠直肠组织 IKK-β、IκB-α、p-IκB-α、Caspase-8及NF-κB p50 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组大鼠直肠组织 IKK-β、p-IκB-α、Caspase-8及胞核NF-κB p50 蛋白相对表达量均升高($P < 0.05$),IκB-α、胞浆NF-κB p50 蛋白相对表达量均降低($P <$

0.05);经过不同治疗后,与模型组相比,地塞米松及中、高剂量 GRg3 治疗组 IKK-β、p-IκB-α、Caspase-8及胞核NF-κB p50 蛋白相对表达量均降低($P < 0.05$),IκB-α及胞浆NF-κB p50 蛋白相对表达量均升高($P < 0.05$)。中、高剂量 GRg3 治疗组与地塞米松组各因子蛋白相对表达量比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表4和图5。

表 4 各组大鼠直肠组织 IKK-β、IκB-α、p-IκB-α、Caspase-8及NF-κB p50 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IKK-β	IκB-α	p-IκB-α	Caspase-8	胞核NF-κB p50	胞浆NF-κB p50
对照组	8	0.52 ± 0.03	1.84 ± 0.25	0.49 ± 0.19	0.70 ± 0.02	0.37 ± 0.05	2.46 ± 0.27
模型组	7	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.07
地塞米松组	7	0.55 ± 0.10	1.93 ± 0.38	0.34 ± 0.07	0.34 ± 0.04	0.43 ± 0.05	2.98 ± 0.24
低剂量GRg3治疗组	7	0.61 ± 0.14	1.83 ± 0.15	0.72 ± 0.06	0.60 ± 0.12	0.90 ± 0.10	1.91 ± 0.21
中剂量GRg3治疗组	8	0.42 ± 0.07	2.36 ± 0.32	0.49 ± 0.09	0.54 ± 0.03	0.45 ± 0.06	3.06 ± 0.66
高剂量GRg3治疗组	8	0.30 ± 0.05	2.62 ± 0.30	0.40 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.03	3.41 ± 0.65
F 值		10.068	8.797	9.753	23.806	34.767	13.709
P 值		0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000



1: 对照组; 2: 模型组; 3: 地塞米松组; 4: 低剂量 GRg3 治疗组; 5: 中剂量 GRg3 治疗组; 6: 高剂量 GRg3 治疗组。①与模型组比较, $P < 0.05$; ②与地塞米松组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 大鼠直肠组织 IKK-β、IκB-α、p-IκB-α、胞浆 p50、胞核 p50 及 Caspase-8 蛋白表达

3 讨论

随着祖国传统医学的发展, 中药药理作用机制的研究也逐渐深入, 与化学药和生物药相比, 多成分、多靶点、不良反应少是中药治疗疾病的独特优势。人参作为中国传统中草药之一, 其使用历史已有 2 000 多年, 在祖国医学滋补药物中有重要地位, 具有广泛的药用价值。人参皂苷 Rg3 是从人参中提取的主要活性成分之一, 分子式为 $C_{42}H_{72}O_{13}$, 具有抑制肿瘤血管生成^[9]、调控肿瘤细胞周期^[4]、提高化疗药物敏感性^[10]等多种功能。随着药物研究的深入, GRg3 被证实具有强大的抗炎作用。其可以诱导 M2 巨噬细胞极化以加速炎症消退, 并通过 MAPK/NF- κ B 信号通路抑制肥大细胞介导的过敏性炎症^[11]。在脓毒症模型中, GRg3 通过激活 AMPK 信号通路发挥线粒体保护功能, 促进线粒体自噬, AMPK 可作为 GRg3 诱导线粒体自噬和缓解氧化应激的靶点, 从而保护脓毒症引起的细胞和器官损伤^[12]。研究发现 GRg3 可作为关节炎患者的辅助治疗, 其通过逆转 TNF- α 抑制的沉默信息调节因子 1 表达, 激活 SIRT1/PGC-1 α /SIRT3 信号通路, 从而下调 NF- κ B 的核转位以减轻炎症反应^[13]。本课题组前期亦证实了 GRg3 可以通过降低 RP 大鼠直肠组织细胞 Bax、NF- κ B P50 及 TNF- α 水平来治疗 RP^[7]。

电离辐射等刺激因素引起的炎症过程是细胞的首要防御机制, 这个过程中常伴随多种促炎和抗炎因子的产生, 辐射后炎症相关细胞因子水平的失衡可对细胞和组织造成持续的损伤^[14]。TNF- α 是一种参与炎症的细胞信号蛋白, 也是构成炎症急性期反应的细胞因子之一, 主要由活化的巨噬细胞产生^[15]。研究显示, 不论是 RP 患者血清^[16]还是 RP 模型大鼠的直肠组织^[17], TNF- α 水平均升高。IL-4 和 IL-10 同属抗炎细胞因子, 由 Th2 细胞分泌, 通过抑制 Th1 细胞增殖, 阻断促炎细胞因子的产生和降低抗原递呈细胞的功能下调炎症反应^[18]。研究表明, RP 模型大鼠肠黏膜 TNF- α 表达升高, IL-4 和 IL-10 表达降低, 辐射破坏了肠道促炎因子和抗炎因子的平衡从而引发 RP^[19], 这与本研究结果一致, 进一步证明了 GRg3 可以降低 TNF- α , 升高 IL-4 和 IL-10。

NF- κ B 的激活在细胞炎症损伤、免疫应答过程中发挥重要作用, 正常条件下, NF- κ B 与 I κ B 结合以无活性的形式存在于细胞质内, 因此, 选择性抑制

NF- κ B 信号通路的激活是治疗炎症性疾病的重要目标。临床广泛使用的调节 NF- κ B 活性的药物主要有糖皮质激素、非甾体抗炎药和某些抗风湿药等。例如, 糖皮质激素通过诱导 I κ B- α 的转录和合成, 从而增加 NF- κ B 在胞浆的滞留^[20]; 柳氮磺吡啶可以直接抑制 NF- κ B 的核转位^[21]; 大剂量阿司匹林则能通过抑制 IKK 的活性产生疗效^[22]。作为中草药人参中提取的主要成分, 人参皂苷 Rg3 也被证实多种疾病中通过调节 NF- κ B 信号通路发挥治疗作用。MA 等^[23]研究显示, GRg3 可通过抑制 p-I κ B 的活性而抑制 NF- κ B 活化, 减轻兔耳肥厚性瘢痕的形成; GRg3 可通过下调人炎症气道上皮细胞和哮喘气道上皮组织 NF- κ B 的活性, 降低炎症因子水平^[21]; 另外, GRg3 还可通过抑制 NF- κ B 的活性抑制癌细胞的迁移、增殖^[24-25]。本研究中, 与模型组相比, 高剂量 GRg3 组大鼠直肠组织中 IKK- β 、I κ B- α 基因表达明显减少, IKK- β 、p-I κ B- α 及胞核中 p50 蛋白表达减少, I κ B- α 和胞浆中 p50 蛋白表达升高。表明 GRg3 可以通过抑制 IKK- β 的表达, 减少 I κ B- α 的磷酸化, 增加胞浆中 NF- κ B p50 的滞留减轻 RP, 促进肠道组织损伤修复。

细胞凋亡是人体正常发育和组织稳态所必需的基本生物学过程, 由一种特殊的蛋白酶——半胱氨酸蛋白酶启动并执行。在不同的环境下, 电离辐射可诱导细胞通过不同的信号转导机制产生死亡, 作为细胞凋亡的启动者, Caspase-8 的激活在这个过程中占据着十分重要的地位^[26]。若想阻止辐射引起的凋亡损伤, 抑制 Caspase-8 的活化是一个重要的环节。既往研究表明, GRg3 可明显降低凋亡因子 Bax 的表达^[7]。本研究中, 经 GRg3 干预后, 大鼠直肠组织 Caspase-8 基因及蛋白水平均降低, 证明了 GRg3 能抑制电离辐射引起的肠道细胞凋亡, 这对 RP 的治疗也同样发挥着重要作用。

综上所述, GRg3 可通过两方面发挥对 RP 的治疗作用。其一, 抑制炎症反应, GRg3 可以通过抑制 IKK- β 的表达, 减少 I κ B- α 的磷酸化, 增加胞浆中 NF- κ B p50 的滞留减轻 RP, 促进肠道组织损伤修复; 其二, 抑制肠道细胞凋亡, GRg3 能抑制电离辐射引起的肠道细胞凋亡减轻炎症反应。未来会进一步分析 GRg3 对肠道内微生物菌群的作用, 以期为 GRg3 治疗 RP 提供更详实的依据。

参考文献：

- [1] ALPUIM COSTA D, AMARO C E, NUNES A, et al. Hyperbaric oxygen therapy as a complementary treatment for radiation proctitis: useless or useful? - A literature review[J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(27): 4413-4428.
- [2] LU W S, XIE Y L, HUANG B J, et al. Platelet-derived growth factor C signaling is a potential therapeutic target for radiation proctopathy[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(582): eabc2344.
- [3] HUANG K, ZHAO X L, YU J F, et al. Transcolonoscopic spraying formalin solution for hemorrhagic radiation proctitis: a retrospective analysis[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2024, 10: 1241833.
- [4] PENG Y F, ZHANG R, YANG X, et al. Ginsenoside Rg3 suppresses the proliferation of prostate cancer cell line PC3 through ROS-induced cell cycle arrest[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 1139-1145.
- [5] HONG S Z, CAI W J, HUANG Z C, et al. Ginsenoside Rg3 enhances the anticancer effect of 5-FU in colon cancer cells via the PI3K/AKT pathway[J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(4): 1333-1342.
- [6] LIU T G, DUO L N, DUAN P. Ginsenoside Rg3 sensitizes colorectal cancer to radiotherapy through downregulation of proliferative and angiogenic biomarkers[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 1580427.
- [7] 扈婷婷, 蔡宏懿. 人参皂苷 Rg3 对大鼠急性放射性直肠炎的实验研究[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2019, 28(11): 854-857.
- [8] 扈婷婷, 蔡宏懿. 大鼠急性放射性直肠炎模型的建立[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(7): 584-587.
- [9] LIU Y M, LI G C, NING J Y, et al. Unveiling the experimental proof of the anticancer potential of ginsenoside Rg3 (Review)[J]. *Oncol Lett*, 2024, 27(4): 182.
- [10] PAN L L, ZHANG T T, SUN H Y, et al. Ginsenoside Rg3 (Shenyi Capsule) combined with chemotherapy for digestive system cancer in China: a meta-analysis and systematic review[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 2417418.
- [11] KEE J Y, HONG S H. Ginsenoside Rg3 suppresses mast cell-mediated allergic inflammation via mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. *J Ginseng Res*, 2019, 43(2): 282-290.
- [12] XING W, YANG L, PENG Y, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates sepsis-induced injury and mitochondrial dysfunction in liver via AMPK-mediated autophagy flux[J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(4): BSR20170934.
- [13] MA C H, CHOU W C, WU C H, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates TNF- α -induced damage in chondrocytes through regulating SIRT1-mediated anti-apoptotic and Anti-inflammatory mechanisms[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(12): 1972.
- [14] KONINGS K, VANDEVOORDE C, BASELET B, et al. Combination therapy with charged particles and molecular targeting: a promising avenue to overcome radioresistance[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 128.
- [15] HU L Q, CHEN H, ZHANG X L, et al. Rosiglitazone ameliorates radiation-induced intestinal inflammation in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome and TNF- α production[J]. *J Radiat Res*, 2020, 61(6): 842-850.
- [16] FERINI G, PERGOLIZZI S. A ten-year-long update on radiation proctitis among prostate cancer patients treated with curative external beam radiotherapy[J]. *In Vivo*, 2021, 35(3): 1379-1391.
- [17] YAVUZ E, KARAGULLE O O, ERCAN G, et al. Evaluation of prophylactic and therapeutic effects of ruscogenin on acute radiation proctitis: an experimental rat model[J]. *Ann Surg Treat Res*, 2018, 94(4): 174-182.
- [18] HUSSIEN S M, RASHED E R. Immune system modulation by low-dose ionizing radiation-induced adaptive response[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2023, 37: 3946320231172080.
- [19] 洪智攀, 武寒飞, 赵克, 等. 不同照射剂量下大鼠急性放射性肠炎模型的建立与比较[J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(11): 2317-2320.
- [20] JIANG Y Q, LIU B, BAO X M, et al. TNF- α regulates the glucocorticoid receptor alpha expression in human nasal epithelial cells via p65-NF- κ B and p38-MAPK signaling pathways[J]. *Iran J Biotechnol*, 2023, 21(1): e3117.
- [21] MATSUYAMA S, YAMAMOTO R, MURAKAMI K, et al. GM-CSF promotes the survival of peripheral-derived myeloid cells in the central nervous system for Pain-Induced relapse of neuroinflammation[J]. *J Immunol*, 2023, 211(1): 34-42.
- [22] GREANEY J L, SAUNDERS E F H, ALEXANDER L M. Short-term salicylate treatment improves microvascular endothelium-dependent dilation in young adults with major depressive disorder[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2022, 322(5): H880-H889.
- [23] MA L, LI L Y, ZHAO T L. Anti-inflammatory effects of ginsenoside Rg3 on the hypertrophic scar formation via the NF- κ B/I κ B signaling pathway in rabbit ears[J]. *Pharmazie*, 2020, 75(2): 102-106.
- [24] LIU Z Y, LIU T J, LI W, et al. Insights into the antitumor mechanism of ginsenosides Rg3[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(3): 2639-2652.
- [25] YANG X L, ZOU J, CAI H Y, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits colorectal tumor growth via down-regulation of C/EBP β /NF- κ B signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 1240-1245.
- [26] FENG R T, HAN J, ZIEGLER J, et al. Apaf-1 deficiency confers resistance to ultraviolet-induced apoptosis in mouse embryonic fibroblasts by disrupting reactive oxygen species amplification production and mitochondrial pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(5): 889-897.

(张蕾 编辑)

本文引用格式：扈婷婷, 林丽莉, 段小钰, 等. 人参皂苷 Rg3 治疗放射性直肠炎大鼠的作用机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(21): 34-42.

Cite this article as: HU T T, LIN L L, DUAN X Y, et al. Investigation of the mechanism of ginsenoside Rg3 in the treatment of radiation proctitis in rats[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(21): 34-42.